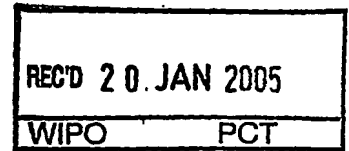


PCT/EP200 4 / 0 1 2 3 8
03 NOV 2003



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2003 A 002115.**



Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

ROMA li.....25 OTT. 2004

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



IL FUNZIONARIO

Eleonora Marinelli
ELEONORA MARINELLI

BEST AVAILABLE COPY

FOGLIO AGGIUNTIVO n.

di totali

DOMANDA N.

REG. A

M/2003A002115

A. RICHIEDENTE (I)

03	Denominazione	UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA (15%)	Residenza	BOLOGNA	codice	01.1317.10.376
	Denominazione		Residenza		codice	
	Denominazione		Residenza		codice	
	Denominazione		Residenza		codice	
	Denominazione		Residenza		codice	
	Denominazione		Residenza		codice	
	Denominazione		Residenza		codice	

E. INVENTORI DESIGNATI

	cognome nome	cognome nome
05	CONTE UBALDO	
06	TORRE MARIA LUISA	
07	ACCORSI PIER ATTILIO	
08	GALEATI GIOVANNA	
09	SPINACT MARCELLA	

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOGLIMENTO RISERVE	
					Data	N° Protocollo

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) | DIEGO GIUGNI

Diego Giugni

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI 2003/002445

REG. A

DATA DI DEPOSITO

03/11/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

11/11/1111

D. TITOLO

ALLESTIMENTO DI SISTEMI DI COLTURA TRIDIMENSIONALE IN MATRICE BICOMPATIBILE DI
CELLULE FOLLICOLARI OVARICHE E DI FOLLICOLI OVARICI DI MAMMIFERO

L. RIASSUNTO

Viene descritto un procedimento per incapsulare ed immobilizzare cellule staminali, cellule follicolari ovariche, gameti, follicoli ovarici o embrioni di mammifero che risultano in grado di autoorganizzarsi in vitro in strutture tridimensionali, ed esprimono funzioni biologiche con modalità simili a quelle che si osservano nell'organismo in vivo.

Le capsule sono costituite da:

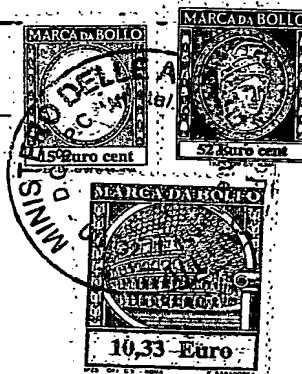
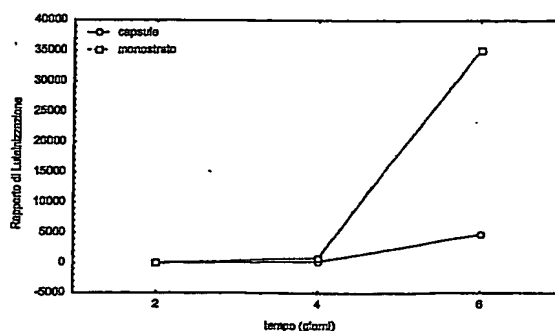
- un nucleo contenente cellule staminali, cellule follicolari ovariche, gameti, follicoli ovarici o embrioni di mammifero e/o un polimero biocompatibile e/o biodegradabile;

- una membrana semipermeabile costituita da un sale di un metallo bivalente o trivalente dell'acido alginico, eventualmente reticolato sulla superficie interna e/o esterna e/o su entrambe le superfici, veicolante eventualmente una seconda specie o più specie cellulari.

Le cellule e i follicoli allestiti e coltivate con questa metodologia sono utilizzate per la produzione in vitro e/o in vivo di peptidi, proteine, anticorpi, ormoni e precursori di ormoni, metaboliti e cataboliti tipici di queste strutture cellulari, membrane plasmatiche, membrane nucleari, organuli citoplasmatici, nuclei di cellule somatiche o di gameti ed embrioni.

M. DISEGNO

Figura 1 - Indici di luteinizzazione delle cellule della granulosa di bovino coltivate in monostrato e nelle capsule in funzione del tempo di coltura.



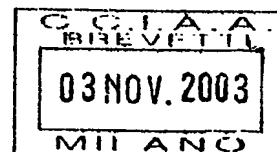
Titolari: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO, UNIVERSITA'
DEGLI STUDI DI PAVIA, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA.

MI 2003A002115

I0106772/CB

Campo dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce a capsule di membrana semipermeabile contenenti cellule o follicoli di diversa natura per la produzione di organi, tessuti o sostanze biologiche in vitro e in vivo.



Descrizione

Negli ultimi anni grande interesse è stato rivolto allo studio di nuove tecnologie atte all'incapsulazione all'interno di membrane semipermeabili e biocompatibili di cellule vive, con l'obiettivo di trapiantare, cellule, tessuti o parti di tessuti in un organismo vivente senza ricorrere all'impiego di farmaci immunosoppressori (Uludag et al., 2000). Attualmente la coltura in vitro di cellule isolate viene effettuata prevalentemente in medium liquido o in monostrato su opportune piastre di coltura, mantenute in opportune condizioni di temperatura ed umidità. Entrambi questi metodi, possono simulare solo in piccola parte la complessità dell'organismo in toto, essendo le cellule private della loro matrice extracellulare tessuto-specifica. In assenza di una matrice extracellulare, durante la coltura le cellule vanno frequentemente incontro ad alterazioni della

morfologia e delle proprietà biochimiche e funzionali, soprattutto a causa dell'adesione delle cellule ad un substrato inadatto, da un inadeguato apporto di nutrienti e da una crescita bidimensionale. (Sittinger et al., 1996).


Nel loro ambiente naturale, le cellule si trovano in un complesso sistema tridimensionale costituito da un'intricata rete di proteine e polisaccaridi che svolge un ruolo dinamico nella regolazione della funzionalità cellulare (Li, 1998). Per ottenere uno sviluppo in vitro di cellule o tessuti risulta quindi indispensabile la formazione di una matrice extracellulare quanto più simile a quella fisiologica, che permetta un'organizzazione tridimensionale delle cellule. Tale disposizione, potenzialmente simile a quella presente nel tessuto vivente è in grado di evitare l'aggregazione delle cellule in ammassi densi con perdita di efficienza e di funzionalità.

Molti Autori hanno utilizzato differenti tipi di matrici polimeriche (scaffold), per consentire lo sviluppo in vitro delle cellule isolate. Tali matrici presentano un'elevata porosità e sono in grado di fornire siti d'attacco adeguati per l'orientamento e la crescita di un sufficiente numero di cellule, in modo da garantirne la sopravvivenza ed una funzionalità simile a

quella in vivo (Shapiro e Cohen, 1997). Per ottenere un'adeguata crescita delle cellule, è necessaria un'uniformità strutturale dello scaffold polimerico che deve essere costituito da materiale biocompatibile con opportune caratteristiche meccaniche (Kuo e Ma, 2001).

Un differente approccio per ottenere sistemi di coltura tridimensionale è l'incapsulazione di cellule, intrappolando una popolazione di cellule vive in una matrice extracellulare artificiale entro i confini di membrane semipermeabili, isolandole fisicamente dall'ambiente esterno. La matrice extracellulare all'interno della capsula è essenziale affinché le cellule si autoorganizzino in strutture funzionalmente simili ai tessuti in vivo.

Fu Chang che ottenne "cellule artificiali": sistemi costituiti da materiali polimerici, atti ad incapsulare proteine, enzimi o cellule (Chang, 1964). Una delle prime applicazioni è stata la veicolazione di cellule pancreatiche in capsule di alginato per il trattamento del diabete (Lim e Sun, 1980). Cellule o tessuti venivano sospesi in alginato di sodio, e tale sospensione veniva estrusa in una soluzione contenente cationi bivalenti, quali gli ioni calcio: gli ioni determinavano la gelificazione del polimero e la trasformazione della sospensione in una matrice rigida (bead). Mediante


Dr. Diego GIUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)



successivo trattamento con una soluzione di poli-L-lisina, sulla superficie delle capsule si formava una membrana permanente semipermeabile la cui porosità poteva essere modulata in relazione al peso molecolare ed alla concentrazione della poli-L-lisina, ed in base alla concentrazione ed al tipo di alginato impiegato (De Vos et al., 1993).

Recentemente, Mauchamp et al. (1998) hanno trovato che cellule follicolari tiroidee di suino isolate si organizzano in pseudofollicoli qualora possano aderire su una matrice di collagene di tipo I. Tali strutture non si ottengono con colture cellulari in monostrato.

Per la sopravvivenza e l'autorganizzazione di cellule vive incapsulate risulta indispensabile una adeguata permeabilità della membrana polimerica (cut off). La membrana ideale dovrebbe consentire l'entrata di molecole essenziali per la sopravvivenza delle cellule e l'eliminazione di sostanze secrete e dei prodotti di scarto del metabolismo cellulare (Colton, 1996); dovrebbe, inoltre, determinare una condizione di immunoisolamento, evitando l'ingresso nell'ambiente cellulare degli effettori della risposta immunitaria dell'organismo.

Le membrane semipermeabili, con preciso cut-off molecolare, consentono la diffusione delle secrezioni

cellulari, dei cataboliti e di metaboliti. La permeabilità e la selettività delle membrane rappresentano pertanto un primo aspetto critico nello sviluppo di questo tipo di sistemi. Risultano indispensabili adeguate proprietà meccaniche delle capsule, sia in termini di resistenza alla rottura, che in termini di elasticità, la distribuzione dimensionale, le proprietà superficiali.

I follicoli ovarici primordiali sono strutture caratterizzate da un singolo strato di cellule piatte simili a quelle epiteliali: tali cellule, durante la maturazione dei follicoli, diventano di forma cuboidale e iniziano a dividersi, differenziandosi in cellule della teca esterna, della teca interna e della granulosa. Durante tutto il periodo di maturazione in vivo a follicolo di Graaf, le cellule della granulosa sono in grado di produrre prevalentemente estrogeni attraverso il sistema enzimatico delle aromatasi che utilizzano come substrato androgeni e progesterone. A seguito del processo di ovulazione le cellule della granulosa si differenziano morfologicamente e funzionalmente orientandosi verso la biosintesi di progesterone.

Recentemente è stata sviluppata una nuova tecnologia di incapsulazione di cellule vive ed in particolare di spermatozoi di suino (EP0922451). Il materiale seminale


Dr. Diego GIUGNI

N. Iscr. ALBO 934 B

(in proprio e per gli altri)

viene addizionato di ioni bivalenti e tale sospensione viene estrusa in una soluzione acquosa di alginato sodico. A contatto con la soluzione di alginato gli ioni bivalenti diffondono verso la superficie esterna inducendo la gelificazione dell'alginato attorno alla sospensione cellulare. Tali capsule possono essere reticolate sulla superficie esterna con poliamine, quale per esempio la protamina, modificando quindi le proprietà meccaniche e la permeabilità della membrana.

Il vantaggio di questa tecnologia rispetto alle altre tecniche di incapsulazione e microincapsulazione è che le tappe del processo vengono ridotte e le cellule contenute non subiscono stress chimici o fisici in grado di compromettere la loro funzionalità e struttura.

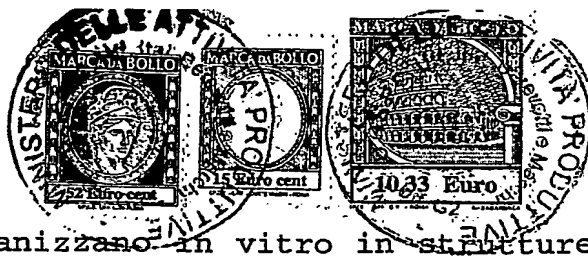
Descrizione dettagliata dell'invenzione

Non è stato finora riportato in letteratura alcun tentativo di incapsulazione di cellule follicolari ovariche e follicoli ovarici di mammifero. Risulta particolarmente interessante l'utilizzo e la coltura di follicoli ovarici, di cellule della granulosa di bovini, equini, ovi-caprini, suini, canidi, felidi, lagomorfi, topi e ratti e specie da laboratorio in genere, nonché umane, ma preferibilmente da suini e bovini, in quanto tali cellule, opportunamente coltivate producono ormoni o proteine e/o sostanze biologicamente attive analogamente

a quanto dette cellule sono in grado di produrre in vivo. Queste sostanze fisiologicamente prodotte concorrono alla maturazione dell'ocita.

La presente invenzione riguarda una tecnologia di incapsulazione di cellule follicolari ovariche, gameti maturi ed immaturi, embrioni e dei follicoli ovarici a vario grado di sviluppo di mammifero in matrice biocompatibile, inclusa in una membrana di un sale di un metallo bivalente o trivalente dell'acido alginico, eventualmente reticolata sulla superficie interna e/o esterna e/o su entrambe le superfici. Oltre alle suddette specie cellulari, nelle capsule possono essere veicolate cellule staminali di differente provenienza; queste ultime, infatti, presentano caratteristiche morfologiche e funzionali simili alle cellule della granulosa che costituiscono i follicoli primordiali. Inoltre, possono essere veicolate nelle capsule cellule somatiche maschili e femminili modificate geneticamente, ad esempio cellule pancreatiche e tiroidee. Cellule, parti di tessuto o di organo, tessuti od organi, gameti od embrioni possono essere conservati in attesa della incapsulazione a temperatura di laboratorio, oppure mediante refrigerazione, congelamento, crioconservazione o liofilizzazione.

Le cellule veicolate nelle capsule si



autoorganizzano in vitro in strutture tridimensionali di tipo follicolare, parenchimatoso o alveolare, che consentono la crescita in vitro di tessuti e strutture pluricellulari funzionalmente simili agli organi nell'organismo in toto.

Dette strutture cellulari esprimono funzioni biologiche che attualmente non possono essere riprodotte in vitro con altre tecnologie di coltura cellulare. La struttura della capsula consente di ottenere un microambiente simile a quello fisiologico, caratterizzato dalla presenza di una matrice extracellulare e da una membrana semipermeabile che funge da membrana basale.

Le colture cellulari ottenute con questa metodologia sono utili per la produzione di peptidi, proteine, ormoni, per saggi biologici di farmaci, di ormoni e precursori di ormoni, per valutazioni di efficacia di farmaci e di tossicità e teratogenicità di sostanze chimiche e farmacologiche, per migliorare le rese di coltura e cocoltura in vitro di oocellule, follicoli ed embrioni nelle pratiche sperimentali ed applicative delle biotecnologie riproduttive. Tali colture cellulari possono, inoltre, essere impiantate in individui come terapia sostitutiva di tipo ormonale, infatti il film polimerico (cioè la membrana che riveste la capsula) che circonda il tessuto artificiale, veicolato all'interno

della capsula, costituisce una barriera immunoprotettrice che consente di evitare l'impiego di farmaci immunosoppressori.

In particolare, le cellule follicolari ovariche e follicoli ovarici di mammifero incapsulati sono in grado di produrre progesterone (P4) e 17β -estradiolo (E2) analogamente a quanto avviene in vivo.

Le capsule sono essenzialmente costituite da:

- un nucleo contenente cellule staminali, cellule del follicolo ovarico, gameti ed embrioni o follicoli ovarici di mammifero e/o un polimero biocompatibile e/o biodegradabile;

- da una membrana semipermeabile costituita da un sale di un metallo bivalente o trivalente di un polimero biocompatibile e biodegradabile quale ad esempio l'acido alginico, eventualmente reticolata sulla superficie interna e/o esterna e/o su entrambe le superfici veicolante eventualmente una seconda tipologia cellulare.

In detto nucleo le cellule si trovano sospese in un mezzo gelatinoso.

Gli organi od i tessuti vengono prelevati da soggetti appartenenti a differenti specie di mammiferi, quali bovini, equini, ovi-caprini, lagomorfi, suini, canidi, felidi, roditori ed eventualmente umani, ma preferibilmente da suini e bovini. Tale prelievo può

essere effettuato in sede di macellazione, durante prelievi di materiale biotico o svolgimento di interventi chirurgici, ma per gli animali da reddito preferibilmente in sede di regolare macellazione. Vengono prelevati i tessuti o gli organi di interesse, preferibilmente gonadi femminili.

Nel caso in cui l'organo di interesse siano le ovaie, queste vengono opportunamente prelevate, lavate con una soluzione fisiologica come noto agli esperti del settore.

Le cellule somatiche interne al follicolo ed i gameti sono isolate dai tessuti mediante aspirazione, centrifugazione dei liquidi follicolari, o digestione della matrice intercellulare come noto agli esperti del settore.

Dopo centrifugazione il sedimento cellulare è lavato mediante ripetuti passaggi in medium di coltura e recuperati con allontanamento del surnatante.

Sul sedimento la concentrazione cellulare viene determinata per conta diretta tramite camera di Makler, o camera di Bürker, o citofluorimetro, o contatori cellulari semiautomatici ed automatici.

Le cellule isolate possono essere sospese nei medium di coltura o mantenimento fino al momento dell'incapsulazione conservandole in un ambiente ad una

temperatura compresa tra temperatura ambiente e - 200 °C e umidità compresa tra 40% e 100%, come noto agli esperti del settore.

Quali medium di coltura o mantenimento possono essere impiegati: soluzione fisiologica, soluzione glucosata, Basal Medium Eagle (BME) e derivati, soluzione di sali di Hanks e derivati, tissue culture medium 199 (TCM 199) e derivati, phosphate buffered saline (PBS) e derivati, soluzione di sali di Krebs e derivati, Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) e derivati, tris-buffered medium (TBM) e derivati, soluzione di sali di Tyrode e derivati, Modified sperm washing medium, modified human tubal fluid, Modified ham's F-10 medium, Upgraded B2 INRA medium, B2 INRA Menezo Medium, Upgraded B9 medium e diversi altri medium di coltura utilizzati specificamente dagli esperti del settore, ma preferibilmente TCM 199 e derivati come è ben noto ad ogni esperto del settore.

Secondo la presente invenzione le cellule, sospese nel medium di coltura o nel liquido follicolare, possono essere eventualmente diluite in un medium di coltura contenente un polimero idrofilo che costituisce la matrice extracellulare artificiale. Il rapporto di diluizione sedimento cellulare-soluzione polimerica può essere compreso tra 1:0.05 e 1:200, e preferibilmente tra 1:0.1 a 1:100.


Dr. Diego GIUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)



Il materiale polimerico costituente la matrice extracellulare artificiale del nucleo delle capsule oggetto della presente invenzione è preferibilmente scelto nel gruppo costituito da: glucani, scleroglucani, mannani, galattomannani, gellani, carragenani, pectine, polianidridi, poliamminoacidi, poliammine, xantani, cellulose e derivati, carbossimetilcellulosa, etilcellulosa, metilcellulosa, idrossipropilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, polivinilalcoli, carbossivinilpolimeri, amidi, collageni, chitine, chitosani, acido alginico, acido ialuronico. Tali polimeri, in soluzione acquosa, ad un opportuno valore di pH che è funzione della natura del polimero come è noto agli esperti del settore, sono generalmente utilizzati in concentrazioni comprese tra lo 0.01% e il 90% del peso totale della capsula, ma preferibilmente tra il 0.5% e il 50%. Preferibilmente si impiega come matrice extracellulare artificiale la gomma xantano a differenti viscosità, in genere compresa tra 800 cP e 1200 cP.

La membrana delle capsule oggetto della presente invenzione è generalmente costituita da alginati di metalli bivalenti quali calcio, bario, stronzio, zinco e trivalenti quali alluminio, ferro e cromo.

Nella preparazione delle capsule oggetto della presente invenzione, la sospensione di cellule viene


Dr. Diego Diugni

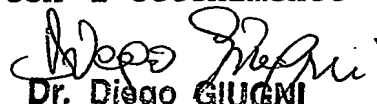
N. Iscr. ALBO 934 B

(in proprio e per gli altri)

addizionata di uno ione bivalente o trivalente, il quale ione viene aggiunto, preferibilmente come cloruro o solfato in soluzione sino ad ottenere concentrazioni del catione comprese tra 1 e 500 mmoli/L e preferibilmente tra 5 e 200 mmoli/L. Il rapporto tra il volume della sospensione cellulare estrusa e la soluzione di alginato può essere compresa tra 1:1 e 1:250, e preferibilmente tra 1:15 e 1:50.

La sospensione cellulare viene successivamente estrusa attraverso estrusori, orifizi, ugelli o aghi, di dimensioni comprese tra 50µm ed 5000µm, preferibilmente attraverso aghi con diametro interno compreso tra i 300µm e 2000µm in una soluzione di alginato sodico in medium, mantenuta in agitazione, a velocità comprese tra 10 e 200 rpm, ma preferibilmente tra 20 e 100 rpm. Gli alginati impiegati nella preparazione delle capsule oggetto della presente invenzione presentano in soluzione al 2% in acqua una viscosità a 25°C compresa tra 200 cP e 20000 cP. La concentrazione di alginato nelle soluzioni è compresa tra lo 0.01% e il 5% p/v, ma preferibilmente tra lo 0.1% e 1%.

La presenza degli ioni bivalenti e trivalenti nella sospensione cellulare estrusa induce la gelificazione dell'alginato all'interfaccia della goccia e la formazione di una membrana gelatinosa con l'ottenimento


Dr. Diego GIUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)

della capsula.

Tali operazioni vengono condotte a temperature comprese tra i 5°C ed i 40°C, e preferibilmente a 20-30°C; l'estrusione avviene mediante microincapsulatori automatici, semiautomatici, pompe peristaltiche, a stantuffo o alternative, oppure con una siringa ad attivazione manuale, od opportuno sistema, ad una velocità tale da produrre da 10 a 250 gocce/minuto, e preferibilmente 60 gocce/minuto.

Dette capsule, possono essere sottoposte al processo di reticolazione mediante polimerizzazione interfacciale dell'alginato utilizzando agenti reticolanti di tipo poliamminico quali ad esempio: protamina solfato o fosfato, preferibilmente sotto forma di soluzione in concentrazioni comprese tra lo 0.01% ed il 5% p/v, oppure poli L-lisina bromidrato di peso molecolare compreso tra 1000 Da ed 800000 Da in soluzione a concentrazione preferibilmente compresa tra 0.01% e 5% p/v, oppure polivinilammina in concentrazione dallo 0.01% al 5% p/v, oppure chitosani con peso molecolare compreso tra 15000 Da e 1.000.000 Da in concentrazioni comprese tra lo 0.01% ed il 5% p/v.

La reazione di reticolazione viene condotta a temperatura compresa tra i 5°C ed i 40°C, e preferibilmente a 25°C per tempi compresi tra 1 minuto e

120 minuti, preferibilmente compresi tra 3 e 30 minuti. Questa procedura determina la conversione della membrana gelatinosa in una membrana rigida semipermeabile di alginato reticolato. Dette capsule presentano una membrana di tipo reticolato e vengono recuperate mediante filtrazione, lavate e sospese in un medium opportuno di mantenimento come noto agli esperti del settore.

Si ottengono capsule di forma sferoidale di dimensioni comprese tra 0.5 e 30 mm, ma preferibilmente compreso tra 2 mm e 10 mm, con spessore della membrana compreso tra 300 μ m e 5000 μ m. Il peso delle capsule prodotte è compreso tra 5 mg e 200 mg, ma preferibilmente tra 20mg e 100 mg.

Dette capsule sospese nel medium sono conservate a temperature comprese tra -200°C e 40°C ma preferibilmente tra 4°C e 40°C, e ancor più preferibilmente a 38.5°C, eventualmente in atmosfera controllata come noto agli esperti del settore.

Utilizzando strumentazione monouso predisposta e preconfezionata, per preparazioni singole e/o multiple, possono essere preparate capsule partendo da materie prime, previamente preparate, predosate e preconfezionate.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è pertanto un kit per la preparazione delle capsule,



secondo l'invenzione, comprendente materie prime, previamente preparate, predosate e preconfezionate nonché relativo materiale monouso, sterile, non sterile o sterilizzabile. La preparazione delle capsule può essere effettuata veicolando in dette capsule: cellule, tessuti, parti di tessuto, organi, parti di organi, stipiti cellulari, gameti ed embrioni con prelievo a fresco e/o opportunamente conservati secondo le tecniche note agli esperti del settore.

Capsule contenenti stipiti cellulari, tessuti, organi o parte di essi, gameti ed embrioni possono essere coincubate, in opportuno medium di coltura, con altri stipiti cellulari, tessuti, organi o parte di essi, gameti ed embrioni, favorendo lo sviluppo di stipiti cellulari, tessuti, organi o parte di essi, gameti ed embrioni in condizioni che simulano l'ambiente fisiologico.

In tali condizioni viene favorita la biosintesi di specifici prodotti e/o specifiche sostanze biologicamente attive. L'incubazione e/o la coincubazione consentono alle strutture biologiche incapsulate di produrre ormoni, metaboliti, cataboliti ed altre sostanze biologicamente attive.

I metaboliti, cataboliti e le sostanze biologicamente attive prodotte o secrete e sintetizzate

Diego Giugni
Dr. Diego GIUGNI

N. Iscr. ALBO 934 B

(in proprio e per gli altri)

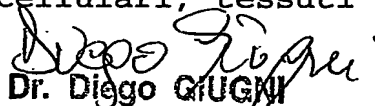
dalle strutture incapsulate possono essere recuperate nei medium di coltura e/o all'interno delle capsule mediante aspirazione o asportati con tecniche note all'esperto del settore.

Detti prodotti del metabolismo, catabolismo e secrezione possono essere estratti, purificati e caratterizzati opportunamente come noto all'esperto del settore, senza danneggiare irreversibilmente il sistema di coltura tridimensionale della capsula.

Detti prodotti possono essere utilizzati direttamente oppure dopo purificazione o concentrazione per modulare crescita, sviluppo, maturazione e funzionalità, di altre cellule, tessuti, organi, gameti ed embrioni, in altri sistemi di coltura in vitro e/o in sistemi ex vivo, e/o in vivo.

Analogamente, secondo tecniche note, possono essere iniettati, microiniettati, inseriti all'interno delle capsule, stipiti cellulari, tessuti e organi o parti di essi autologhi od eterologhi nonché gameti ed embrioni a diversa fase di sviluppo, senza danneggiare irreversibilmente il sistema di coltura tridimensionale della capsula.

Da dette capsule possono essere aspirati o asportati, con mezzi e tecniche note agli esperti del settore, a tempi programmati, stipiti cellulari, tessuti


Dr. Diego GRUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)

od organi o parte di essi, gameti ed embrioni, senza danneggiare irreversibilmente il sistema di coltura tridimensionale della capsula


Si riportano i seguenti esempi a scopo illustrativo ma non limitativo del procedimento di preparazione delle capsule oggetto della presente invenzione.

Esempio 1: incapsulazione e coltura tridimensionale di cellule della granulosa di bovino

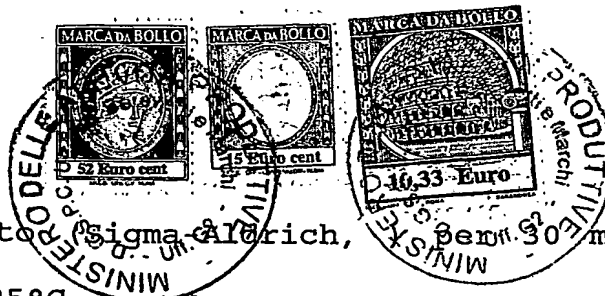
1a) Preparazione delle cellule

Le ovaie a differente stadio del ciclo estrale vengono prelevate da bovine a partire da 16-18 mesi di età, in sede di regolare macellazione, lavate con soluzione fisiologica a 30°C, come noto agli esperti del settore. Dalle ovaie si identificano follicoli di diametro 2-6 mm da cui vengono aspirati mediante siringhe i liquidi follicolari contenenti cellule della granulosa. Le sospensioni cellulari così ottenute vengono centrifugate e lavate due volte con 10 ml di medium TCM199 + 10% di siero fetale bovino + 1% di penicillina/streptomycin. Dopo centrifugazione si ottiene un sedimento cellulare, sul quale si determina la concentrazione cellulare mediante conta diretta con camera di Makler.

1b) Incapsulazione


Dr. Diego GIUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)

Il sedimento cellulare, viene diluito in una soluzione di gomma xantano (Satiaxane®, SKW Biosystems, France) allo 0.5% in medium di coltura TCM199 contenente sali di Earle, L-glutamina e sodio bicarbonato (Sigma-Aldrich,); il rapporto tra sedimento cellulare e soluzione di gomma xantano è di 1:3. Si ottiene una sospensione cellulare che viene addizionata di una soluzione satura di cloruro di bario fino alla concentrazione di 20mmol/L di ione bario. La sospensione risultante è estrusa attraverso aghi (26GX1/2", 0.45X13mm) in una soluzione di alginato di sodio a media viscosità (3500 cP,) allo 0.5% p/v in medium di coltura, mantenuta in agitazione magnetica (30rpm). Il rapporto tra il volume di sospensione cellulare e la soluzione di alginato di sodio è di 1:25. L'estrusione avviene goccia a goccia mediante siringa, alla temperatura di 25°C. Gli ioni bario reagiscono con l'alginato di sodio formando in 30' una membrana di alginato di bario all'interfaccia delle singole gocce di estruso. Si ottengono capsule che vengono raccolte per filtrazione, lavate due volte con medium di coltura e sospese in un'aliquota dello stesso. Dette capsule vengono successivamente reticolate sulla superficie esterna con una soluzione all'1% di protamina solfato (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) in medium di coltura TCM199 contenente sali di Earle, L-glutamina e



sodio bicarbonato Sigma-Aldrich, per 30 minuti alla temperatura di 25°C.

All'interno della capsula reticolata si trova la popolazione delle cellule della granulosa, in una matrice extracellulare artificiale.

Si ottengono capsule di forma sferoidale di dimensioni comprese tra 2 mm e 10 mm e di peso compreso tra 20 mg e 100 mg. Le capsule prodotte possono essere conservate, nelle normali condizioni di laboratorio, in specifici incubatori con ambiente controllato, mediante liofilizzazione, refrigerazione, congelamento o crioconservazione.

1c) Coltura cellulare tridimensionale

Una capsula viene posta in un pozzetto di piastre sterili per colture cellulari sospesa in 600µL di terreno di coltura (TCM199 contenente siero fetale bovino (10%), penicillina/streptomicina (1%) e 3-17androstenedione (100 ng/µL).

Le piastre contenenti le capsule vengono mantenute in incubatore per 6 giorni a 38.5°C, 5% di CO₂ e 90% di umidità.

Da ogni pozzetto a distanza di ogni 48 ore si procede al campionamento del medium contenente i prodotti del metabolismo cellulare; il campione viene congelato prontamente a temperature inferiori a -20°C in provette

Dr. Diego CUGNI
Dr. Diego CUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)

tipo Eppendorf.

Nei pozzetti contenenti le capsule il medium di coltura viene sostituito con equal volume di medium fresco con proseguimento della coltura sul medesimo campione.

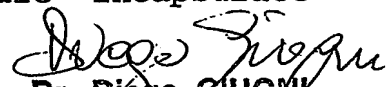
Pertanto su ciascun campione di medium prelevato dai pozzetti è stata valutata l'attività steroidogenica in termini di produzione di progesterone (P4) e di 17β -estradiolo (E2), mediante analisi radioimmunologica (RIA).

I risultati sono espressi come rapporto tra P4 ed E2, noto agli esperti del settore come indice di luteinizzazione.

Tabella 1: indice di luteinizzazione (P4/E2), deviazione standard e numerosità campionaria delle cellule della granulosa di bovino coltivate nelle capsule.

giorni	Media	Dev.Std.	N
2	5,1	32,0	39
4	567,9	2245,3	35
6	9452,5	18254,4	23

Dai risultati riportati in tabella 1 si evince che nelle cellule incapsulate viene mantenuta la vitalità cellulare, con la produzione di entrambi gli ormoni per l'intero periodo di coltura: le cellule incapsulate


Dr. Diego GIUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)

producono basse quantità di progesterone come si verifica in vivo nel follicolo prima della ovulazione.

Ciò indica una ridotta luteinizzazione delle cellule incapsulate che può avvenire soltanto in strutture follicolari molto simili a quelle che si osservano in vivo.

Le informazioni derivate dall'analisi dei risultati evidenziano che le cellule della granulosa bovina incapsulate secondo il procedimento della presente invenzione hanno un'attività steroidea analoga a quella in vivo e ottenibile soltanto con un processo di coltura cellulare di tipo tridimensionale

Esempio 1 di riferimento

E' stata condotta, in parallelo la coltura cellulare in monostrato, valutando, anche in questo caso l'attività steroidogenica in termini di produzione di progesterone (P4) e di 17β -estradiolo (E2); nei campioni di medium prelevati dai pozzetti la concentrazione di tali ormoni è stata valutata mediante analisi radioimmunologica (RIA).

Cellule non incapsulate vengono seminate e coltivate in monostrato in piastre a pozzetti contenenti ciascuno 600 μ L di terreno di coltura utilizzato anche per la coltura delle cellule incapsulate.

Analogamente a quanto descritto per le cellule incapsulate, le piastre contenenti le cellule in

monostrato vengono mantenute in incubatore per 6 giorni a 38.5°C, 5% di CO₂ e 90% di umidità.

Da ogni pozzetto, ogni 48 ore si procede al campionamento del medium contenente i prodotti del metabolismo cellulare, che viene congelato a temperature inferiori a -20°C in provette di Eppendorf. Dai pozzetti contenenti le cellule coltivate in monostrato, il medium di coltura viene completamente prelevato e sostituito con medium fresco con proseguimento della coltura sul medesimo campione. I risultati ottenuti vengono riportati in tabella 2.

Tabella 2: indice di luteinizzazione (P4/E2), deviazione standard e numerosità campionaria delle cellule della granulosa di bovino coltivate in monostrato.

giorni	Media	Dev.Std.	N
2	7,4	38,5	27
4	1700,0	3870,9	23
6	70201,0	131436,5	11

Nella figura 1 sono riportati gli indici di luteinizzazione delle cellule della granulosa di bovino coltivate in monostrato e nelle capsule in funzione del tempo di coltura.

Dai risultati riportati nella figura 1 si evince che con entrambe le tecniche di coltura viene mantenuta la



vitalità cellulare, con la produzione di entrambi gli ormoni per l'intero periodo di coltura.

Per il progesterone sintetizzato da cellule coltivate in monostrato, si osserva un significativo aumento della sua concentrazione il 6° giorno di coltura: questo incremento è indice di una spiccata luteinizzazione cellulare.

Tale aumento non è così evidente per le cellule incapsulate che producono basse quantità di progesterone come si verifica in vivo nel follicolo prima dell'ovulazione.

Ciò indica una ridotta luteinizzazione delle cellule incapsulate e può avvenire soltanto in strutture similfollicolari molto simili a quelle che si osservano in vivo.

Esempio 2: incapsulazione e coltura tridimensionale di cellule della granulosa di suino

2a) Preparazione delle cellule

Le ovaie a differente stadio del ciclo estrale vengono prelevate da soggetti a partire da 6-11 mesi di età, in sede di regolare macellazione, lavate con soluzione fisiologica a 30°C, come noto agli esperti del settore. Dalle ovaie si identificano follicoli di diametro 2-6 mm da cui vengono aspirati mediante siringhe i liquidi follicolari contenenti cellule della granulosa.

Diego Giugni
Dr. Diego GIUGNI

N. Iscr. ALBO 934 B

(in proprio e per gli altri)

Le sospensioni cellulari così ottenute vengono centrifugate e lavate due volte con 10 ml di medium TCM199 + 10% di siero fetale bovino + 1% di penicillina/streptomicina. Dopo centrifugazione si ottiene un sedimento cellulare, sul quale si determina la concentrazione cellulare mediante conta diretta con camera di Makler.

2b) Incapsulazione

Il sedimento cellulare, viene diluito in una soluzione di gomma xantano (Satiaxane®, SKW Biosystems, France) allo 0.5% in medium di coltura TCM199 contenente sali di Earle, L-glutamina e sodio bicarbonato (Sigma-Aldrich,); il rapporto tra sedimento cellulare e soluzione di gomma xantano è di 1:3. Si ottiene una sospensione cellulare che viene addizionata di una soluzione satura di cloruro di bario fino alla concentrazione di 20mmol/L di ione bario. La sospensione risultante è estrusa attraverso aghi (26GX1/2", 0.45X13mm) in una soluzione di alginato di sodio a media viscosità (3500 cP), allo 0.5% p/v in medium di coltura, mantenuta in agitazione magnetica (30rpm). Il rapporto tra il volume di sospensione cellulare e la soluzione di alginato di sodio è di 1:25. L'estrusione avviene goccia a goccia mediante siringa, alla temperatura di 25°C. Gli ioni bario reagiscono con l'alginato di sodio formando in


30' una membrana di alginato di bario all'interfaccia delle singole gocce di estruso. Si ottengono capsule che vengono raccolte per filtrazione, lavate due volte con medium coltura e sospese in un'aliquota dello stesso. Dette capsule vengono successivamente reticolate sulla superficie esterna con una soluzione all'1% di protamina solfato (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) in medium di coltura TCM199 contenente sali di Earle, L-glutamina e sodio bicarbonato (Sigma-Aldrich,) per 30 minuti alla temperatura di 25°C.

All'interno della capsula reticolata si trova la popolazione delle cellule della granulosa, in una matrice extracellulare artificiale.

Si ottengono capsule di forma sferoidale di dimensioni comprese tra 2 mm e 10 mm e di peso compreso tra 20 mg e 100 mg. Le capsule prodotte possono essere conservate, nelle normali condizioni di laboratorio, in specifici incubatori con ambiente controllato, mediante liofilizzazione, refrigerazione, congelamento o crioconservazione.

2c) Coltura cellulare tridimensionale

Una capsula viene posta in un pozzetto di piastre sterili per colture cellulari sospesa in 600µL di terreno di coltura (TCM199 contenente siero fetale bovino (10%), penicillina/streptomicina (1%) e 3-17androstenedione (100


Dr. Diego GIUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)

ng/ μ L)).

Le piastre contenenti le capsule vengono mantenute in incubatore per 6 giorni a 38.5°C, 5% di CO₂ e 90% di umidità.

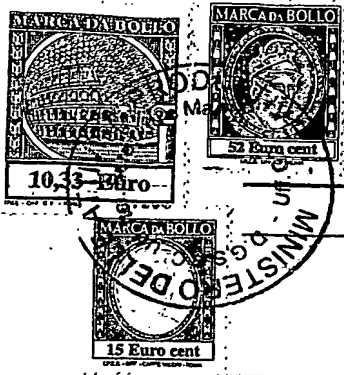
Da ogni pozzetto a distanza di ogni 48 ore si procede al campionamento del medium contenente i prodotti del metabolismo cellulare; il campione viene congelato prontamente a temperature inferiori a -20°C in provette tipo Eppendorf.

Nei pozzetti contenenti le capsule il medium di coltura viene sostituito con equal volume di medium fresco con proseguimento della coltura sul medesimo campione.

Pertanto su ciascun campione di medium prelevato dai pozzetti è stata valutata l'attività steroidogenica in termini di produzione di progesterone (P4) e di 17 β -estradiolo (E2); mediante analisi radioimmunologica (RIA).

I risultati sono espressi come rapporto tra P4 ed E2, noto agli esperti del settore come indice di luteinizzazione.

Tabella 3: indice di luteinizzazione (P4/E2), deviazione standard e numerosità campionaria delle cellule della granulosa di suino coltivate nelle capsule.



giorni	Media	Dev.Std.	N
2	14,8	55,3	38
4	124,0	338,2	30
6	43,7	83,8	20

Dai risultati riportati in tabella 3 si evince che nelle cellule incapsulate viene mantenuta la vitalità cellulare, con la produzione di entrambi gli ormoni per l'intero periodo di coltura: le cellule incapsulate producono basse quantità di progesterone come si verifica in vivo nel follicolo prima della ovulazione.

Ciò indica una ridotta luteinizzazione delle cellule incapsulate che può avvenire soltanto in strutture follicolari molto simili a quelle che si osservano in vivo.

Esempio 2 di riferimento

E' stata condotta, in parallelo la coltura cellulare in monostrato, valutando, anche in questo caso l'attività steroidogenica in termini di produzione di progesterone (P4) e di 17β -estradiolo (E2); nei campioni di medium prelevati dai pozzetti la concentrazione di tali ormoni è stata valutata mediante analisi radioimmunologica (RIA).

Cellule non incapsulate vengono seminate e coltivate in monostrato in piastre a pozzetti contenenti ciascuno 600 μ L di terreno di coltura utilizzato anche per la coltura delle cellule incapsulate.

Analogamente a quanto descritto per le cellule

incapsulate, e piastre contenenti le cellule in monostrato vengono mantenute in incubatore per 6 giorni a 38.5°C, 5% di CO₂ e 90% di umidità.

Da ogni pozzetto, ogni 48 ore si procede al campionamento del medium contenente i prodotti del metabolismo cellulare, che viene congelato a temperature inferiori a -20°C in provette di Eppendorf. Dai pozzetti contenenti le cellule coltivate in monostrato, il medium di coltura viene completamente prelevato e sostituito con medium fresco con proseguimento della coltura sul medesimo campione. I risultati ottenuti vengono riportati in tabella 4.


Tabella 4: indice di luteinizzazione (P4/E2), deviazione standard e numerosità campionaria delle cellule della granulosa di suino coltivate in monostrato.

giorni	Media	Dev.Std.	N
2	2,5	2,3	36
4	22,1	23,4	25
6	2160,9	4997,9	24

Nella figura 2 sono riportati gli indici di luteinizzazione delle cellule della granulosa di suino coltivate in monostrato e nelle capsule in funzione del tempo di coltura.

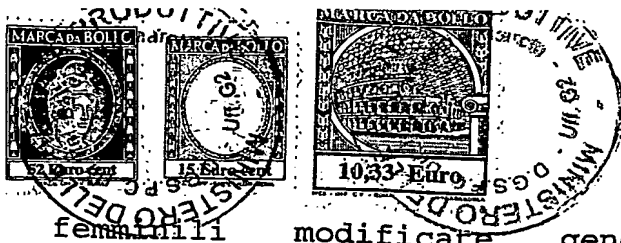
Le informazioni derivate dall'analisi dei risultati evidenziano che le cellule della granulosa suina

incapsulate secondo il procedimento della presente invenzione hanno un'attività steroidea analoga a quella in vivo e ottenibile soltanto con un processo di coltura cellulare di tipo tridimensionale.


Dr. Diego GIUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)

Rivendicazioni

1. Capsule comprendenti una membrana esterna di un sale di un metallo bivalente o trivalente dell'acido alginico, e un nucleo interno comprendente una sospensione di cellule staminali, cellule somatiche maschili e femminili modificate geneticamente, cellule del follicolo ovarico, gameti, follicoli ovarici, embrioni di mammifero e/o un polimero biocompatibile e/o biodegradabile costituente una matrice extracellulare artificiale.
2. Capsule secondo la rivendicazione 1, in cui dette cellule sono sospese in un mezzo gelatinoso.
3. Capsule secondo la rivendicazione 1 o 2 caratterizzate dal fatto che dette cellule staminali, cellule somatiche maschili e femminili modificate geneticamente, cellule del follicolo ovarico, follicoli ovarici, gameti, ed embrioni di mammifero sono autoorganizzate in vitro in strutture tridimensionali di tipo parenchimatoso, follicolare o alveolare, che consentono la crescita in vitro di tessuti e strutture pluricellulari funzionalmente simili ad organi presenti nell'organismo di mammiferi in toto.
4. Capsule secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 3, caratterizzate dal fatto che dette cellule staminali, cellule somatiche maschili e



femminili modificate geneticamente, cellule del follicolo ovarico, gameti, follicoli ovarici ed embrioni di mammifero sono funzionalmente simili agli organi nell'organismo in toto ed in grado di sintetizzare e secernere ormoni quali progesterone (P4) e 17β -estradiolo (E2) e altre sostanze biologicamente attive in quantità simile a quella che dette strutture producono in vivo.

5. Capsule secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 1 alla 4 in cui detta membrana di alginato è gelatinosa, bioerodibile ed è reticolata sulla superficie interna e/o sulla superficie esterna e/o su entrambe le superfici.
6. Capsule secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 1 alla 5 caratterizzate dal fatto che la membrana di alginato può essere reticolata impiegando agenti reticolanti scelti tra: protamina solfato o fosfato, poli L-lisina bromidrato, polivinilammina, oppure chitosani.
7. Capsule secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 1 alla 6 in cui la membrana esterna è costituita da alginati di metalli bivalenti scelti tra: calcio, bario, stronzio, zinco o di metalli trivalenti scelti tra: alluminio, ferro, cromo.
8. Capsule secondo una qualunque delle rivendicazioni

- dalla 1 alla 7 caratterizzate dal fatto che la membrana di alginato contiene una seconda o più specie cellulari.
9. Capsule secondo la rivendicazione 8 caratterizzate dal fatto che la membrana di alginato contiene cellule del follicolo ovarico, uno o più gameti, uno o più follicoli ovarici ed uno o più embrioni di mammifero.
10. Capsule secondo la rivendicazione 8 caratterizzate dal fatto che la membrana di alginato contiene uno o più gameti femminili anche con diverso stadio di sviluppo.
11. Capsule secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 1 alla 10 caratterizzate dal fatto che detto polimero biocompatibile e/o biodegradabile è un polimero idrofilo scelto nel gruppo costituito da: glucani, scleroglucani, mannani, galattomannani, gellani, carragenani, pectine, polianidridi, poliamminoacidi, poliammine, xantani, cellulose e suoi derivati: carbossimetilcellulose, etilcellulose, metilcellulose, idrossipropilcellulose idrossipropilmetilcellulose, polivinilalcoli, carbossivinilpolimeri, amidi, alfa, beta, gamma ciclodestrine e derivati delle destrine in genere, collageni, chitine, chitosani, acido alginico, acido ialuronico.
12. Capsule secondo la rivendicazione 11, caratterizzate dal fatto che detti polimeri, in soluzione acquosa, sono presenti in concentrazioni comprese tra 0.01% e 90% del

peso totale della capsula.

13. Capsule secondo la rivendicazione 12, caratterizzate dal fatto che detti polimeri, in soluzione acquosa, sono presenti in concentrazioni comprese tra 0.5% e 50% del peso totale della capsula.

14. Capsule secondo la rivendicazione 12, caratterizzate dal fatto che il materiale polimerico idrofilo, che costituisce la matrice extracellulare artificiale del nucleo di dette capsule, è gomma xantano avente viscosità compresa tra 800 e 1200 cP.

15. Capsule secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 1 alla 14 caratterizzate dal fatto che dette capsule presentano diametro compreso tra i 0,5 mm ed i 30mm, con spessore della membrana compreso tra 300 µm e 5000 µm.

16. Capsule secondo la rivendicazione 15 caratterizzate dal fatto che dette capsule presentano preferibilmente un diametro compreso tra i 2 mm ed i 10 mm.

17. Capsule secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 1 alla 16 caratterizzate dal fatto che dette capsule pesano tra 5 mg e 200 mg.

18. Capsule secondo la rivendicazione 17 caratterizzate dal fatto che dette capsule pesano preferibilmente tra i 20 mg e i 100 mg.

19. Kit per la preparazione di capsule secondo una

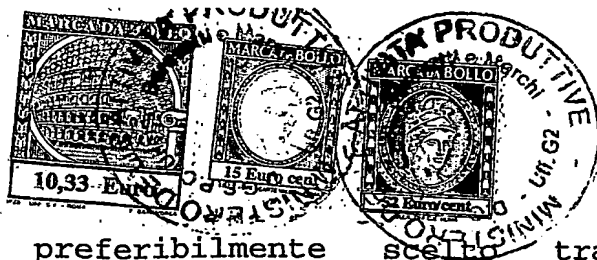
qualunque delle rivendicazioni dalla 1 alla 18 comprendente strumentazione monouso, sterile, non sterile o sterilizzabile, predisposta e preconfezionata per preparazioni singole e/o multiple.

20. Kit secondo la rivendicazione 19 che comprendente sali di uno ione bivalente o trivalente, alginato di un metallo alcalino, in confezioni separate predosate.

21. Kit secondo la rivendicazione 20, comprendente inoltre un polimero biocompatibile e/o biodegradabile idrofilo preferibilmente scelto tra: glucani, scleroglucani, mannani, galattomannani, gellani, carragenani, pectine, polianidridi, poliamminoacidi, poliammine, xantani, cellulose e suoi derivati: carbossimetilcellulose, etilcellulose, metilcellulose, idrossipropilcellulose idrossipropilmetilcellulose, polivinilalcoli, carbossivinilpolimeri, amidi, alfa, beta, gamma ciclodestrine e derivati delle destrine in genere, collageni, chitine, chitosani, acido, alginico, acido ialuronico.

22. Kit secondo la rivendicazione 20 o 21, comprendente inoltre un agente reticolante preferibilmente scelto tra protamina solfato o fosfato, poli L-lisina bromidrato, polivinilammina, oppure chitosani.

23. Kit secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 20 alla 22, comprendente inoltre un medium di coltura



preferibilmente scelto tra: soluzione fisiologica, soluzione glucosata, Basal Medium Eagle (BME) e derivati, soluzione di sali di Hanks e derivati, tissue culture medium 199 (TCM 199) e derivati, phosphate buffered saline (PBS) e derivati, soluzione di sali di Krebs e derivati, Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) e derivati, tris-buffered medium (TBM) e derivati, soluzione di sali di Tyrode e derivati, Modified sperm washing medium, modified human tubal fluid, Modified ham's F-10 medium, Upgraded B2 INRA medium, B2 INRA Menezo Medium, Upgraded B9 medium.

24. Kit secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 20 alla 23, comprendente inoltre dispositivi di estrusione quali ugelli, aghi o siringhe sterili, non sterili o sterilizzabili.

25. Kit secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 20 alla 24, in cui detti sali di uno ione bivalente o trivalente sono scelti tra: sali di calcio, bario, stronzio, zinco, alluminio, ferro o cromo.

26. Kit secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 20 alla 25, in cui detto alginato è alginato di sodio.

27. Processo per la preparazione delle capsule secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 1 alla 18 che comprende i seguenti passaggi:


a) sospensione delle cellule in un medium di coltura o

in un opportuno liquido biologico, opzionalmente contenente un polimero idrofilo biocompatibile e/o biodegradabile;

- b) aggiunta alla sospensione ottenuta di un sale di uno ione bivalente o trivalente fino ad ottenere concentrazioni dello ione comprese tra 1 e 500 mmoli/L;
- c) estrusione della sospensione cellulare attraverso estrusori, orifizi, ugelli o aghi di dimensioni comprese tra 50 μm e 5000 μm in una soluzione di alginato di un metallo alcalino in medium di coltura, avente concentrazione compresa tra 0,01% e 5% p/v, mantenuta in agitazione a velocità compresa tra 10 e 200 rpm;
- d) opzionalmente, reticolazione delle capsule così formate, mediante polimerizzazione interfacciale dell'alginato utilizzando gli agenti reticolanti, secondo la rivendicazione 5, ad una temperatura compresa tra 5° C e 40° C per un tempo compreso tra 1 minuto e 120 minuti.

28. Processo secondo la rivendicazione 27 comprendente ulteriormente la fase di recupero delle capsule mediante filtrazione, lavaggio delle stesse e loro sospensione in medium di coltura.

29. Processo secondo la rivendicazione 27 comprendente


Dr. Diego GIUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)

ulteriormente la fase di conservazione delle capsule nelle condizioni di coltura in laboratorio, oppure mediante liofilizzazione, refrigerazione, congelamento o crioconservazione.

30. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 27 alla 29 comprendente ulteriormente la fase di veicolazione in dette capsule di cellule, tessuti, parti di tessuto, organi, parti di organi, stipiti cellulari, gameti ed embrioni prelevati di fresco o opportunamente conservati.

31. Processo secondo la rivendicazione 30 in cui, detta fase di veicolazione comprende la fase di iniettare o microiniettare, in dette capsule, cellule, tessuti, parti di tessuto, organi, parti di organi, stipi cellulari, gameti ed embrioni a diversa fase di sviluppo prelevati di fresco o opportunamente conservati.

32. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 27 alla 31 comprendente ulteriormente la fase di incubazione, in un opportuno medium di coltura, di dette capsule con stipiti cellulari, tessuti, organi o parte di essi, gameti ed embrioni.

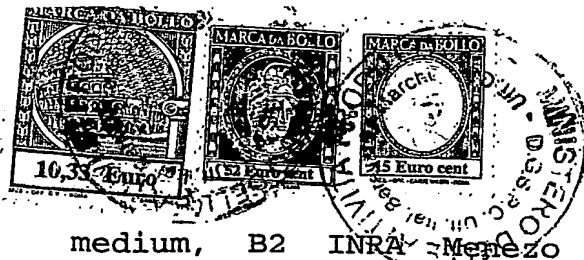
33. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 27 alla 32 comprendente ulteriormente la fase di aspirazione o asportazione, con qualunque mezzo o qualunque tecnica e in qualunque periodo di sviluppo

degli stipiti cellulari, tessuti od organi o parte di essi, gameti, embrioni o sostanze da essi prodotti.

34. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 27 alla 33 comprendente ulteriormente la fase di estrazione, purificazione, caratterizzazione e sequenziazione delle sostanze prodotte quali ormoni, metaboliti, cataboliti ed altre sostanze biologicamente attive.

35. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 34 in cui, nel passaggio (a), detto ione bivalente o trivalente è cloruro o solfato di calcio, bario, stronzio, zinco, alluminio, ferro o cromo in concentrazione compresa tra 5 e 200 mmoli/L.

36. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 35 in cui, nel passaggio (a), il medium di coltura utilizzato è scelto tra: soluzione fisiologica, soluzione glucosata, Basal Medium Eagle (BME) e derivati, soluzione di sali di Hanks e derivati, tissue culture medium 199 (TCM 199) e derivati, phosphate buffered saline (PBS) e derivati, soluzione di sali di Krebs e derivati, Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) e derivati, tris-buffered medium (TBM) e derivati, soluzione di sali di Tyrode e derivati, Modified sperm washing medium, modified human tubal fluid, Modified ham's F-10 medium, Upgraded B2 INRA



medium, B2 INRA-Mezzo Medium, Upgraded B9 medium, opzionalmente contenente un polimero biocompatibile e/o biodegradabile che costituisce la matrice extracellulare artificiale.

37. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 36 in cui, nel passaggio (a), il medium utilizzato è TCM 199 e suoi derivati, contenente un polimero idrofilo che costituisce la matrice extracellulare artificiale.

38. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 37 in cui, nel passaggio (a), il rapporto di diluizione sedimento cellulare / soluzione polimerica è compreso tra 1:0.05 e 1:200.

39. Processo secondo la rivendicazione 38 in cui il rapporto di diluizione sedimento cellulare / soluzione polimerica è compreso tra 1:0.1 a 1:100.

40. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 39 in cui, nel passaggio (c), il rapporto tra il volume della sospensione cellulare estrusa e la soluzione di alginato è compreso tra 1:1 e 1:250.

41. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 40 in cui, nel passaggio (c), l'estrusione avviene mediante microincapsulatori automatici, semiautomatici, pompe peristaltiche, a stantuffo o alternative, oppure con siringa ad attivazione manuale

ad una velocità tale da produrre da 10 a 250 gocce/minuto.

42. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 40 in cui, nel passaggio (c), l'estrusione, con microincapsulatori automatici, semiautomatici, pompe peristaltiche, a stantuffo o alternative oppure con siringa ad attivazione manuale, avviene ad una velocità tale da produrre 60 gocce/minuto.

43. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 40 in cui, nel passaggio (c), l'estrusione della sospensione cellulare avviene attraverso aghi con diametro interno compreso tra 300 μm e 2000 μm .

44. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 43 in cui, nel passaggio (c), la soluzione di alginato è mantenuta in agitazione a velocità compresa tra 20 e 100 rpm ed ha una concentrazione compresa tra 0,1% e 1% p/v..

45. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 44 in cui, nel passaggio (c), il rapporto tra il volume della sospensione cellulare estrusa e la soluzione di alginato è compreso tra 1:15 e 1:50.

46. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 45 in cui detti alginati presentano, in soluzione al 2% in acqua, una viscosità compresa tra 200

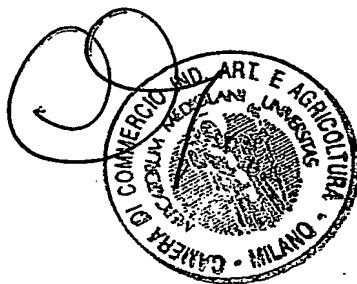
cP e 20000 cP, alla temperatura di 25°C.

47. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 46 in cui i passaggi (a), (b) e (c) vengono condotti ad una temperatura compresa tra 5°C e 40°C.

48. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 47 in cui i passaggi (a), (b) e (c) vengono condotti ad una temperatura compresa tra 20°C e 30°C.

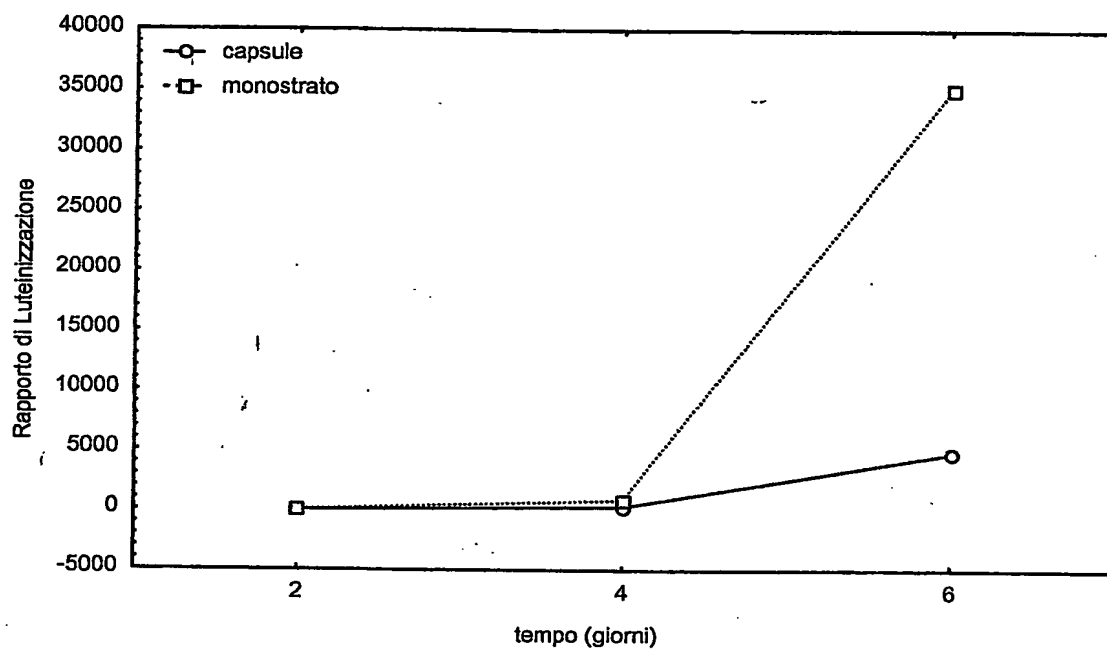
49. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 46 in cui il passaggio (d) viene condotto ad una temperatura compresa tra 5°C e 40°C, per tempi compresi tra 1 minuto e 120 minuti.

50. Processo secondo una qualunque delle rivendicazioni dalla 27 alla 46 in cui il passaggio (d) viene condotto ad una temperatura compresa tra 20°C e 30°C, per tempi compresi tra 3 minuti e 30 minuti.



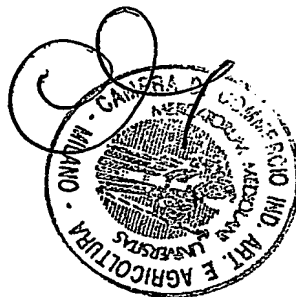
Diego Giugni
Dr. Diego GIUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)

Figura 1 - Indici di luteinizzazione delle cellule della granulosa di bovino coltivate in monostrato e nelle capsule in funzione del tempo di coltura.



MI 200 3 A 0 0 2 1 1 5

p.i.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO
 UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA
 UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

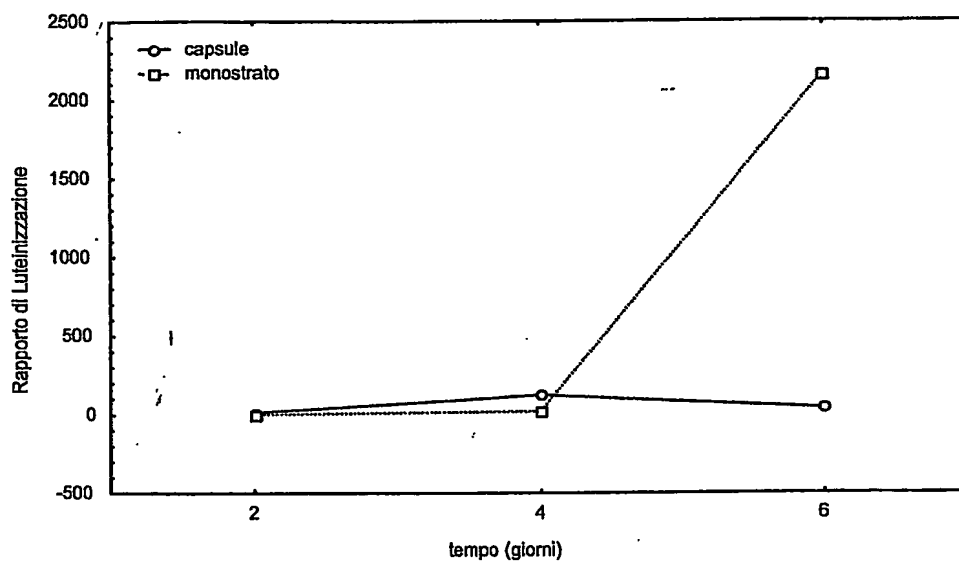


Diego Giugni
 Dr. Diego GIUGNI
 N. Iscr. ALBO 934 B
 (in proprio e per gli altri)

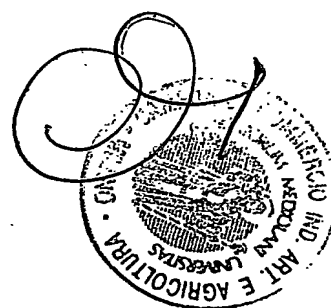


TAV. II

Figura 2 - Indici di luteinizzazione delle cellule della granulosa di suino coltivate in monostrato e nelle capsule in funzione del tempo di coltura.



MI 200 3 A 0 0 2 1 1 5



p.i.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

Diego Grugni
Dr. Diego GRUGNI
N. Iscr. ALBO 934 B
(in proprio e per gli altri)

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.